



(19)

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 853 238 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
15.07.1998 Patentblatt 1998/29

(51) Int. Cl.⁶: G01N 1/42

(21) Anmeldenummer: 98100251.2

(22) Anmeldetag: 09.01.1998

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC
NL PT SE
Benannte Erstattungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(72) Erfinder: Studer, Daniel, Dr.
3293 Dotzigen (BE) (CH)

(74) Vertreter: Dolder, Fritz
Rosenbergstrasse 6
Postfach 558
8304 Wallisellen-Zürich (CH)

(30) Priorität: 13.01.1997 CH 53/97

(71) Anmelder: Studer, Daniel, Dr.
3293 Dotzigen (BE) (CH)

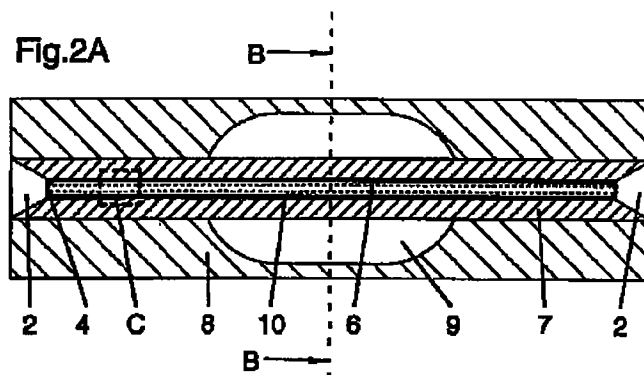
(54) Probenhalter für wasserhaltige Proben sowie Verfahren zu deren Verwendung

(57) Der Probenhalter für wasserhaltige Proben eignet sich vorzugsweise für das Einfrieren unter hohem Druck von biologischen Proben, insbesondere Mikrobiopsieproben. Er weist in einer bevorzugten Ausführungsform eine gut wärmeleitende metallische Kapillare (7) auf, die an beiden Stirnseiten mit je einer Ausnehmung (2) zur Aufnahme der Anschlüsse für ein Druckübertragungsmittel ausgestattet ist. Eine Ummantelung in der Form eines Hohlzylinders (8) umgibt diese Kapillare (7); sie weist in einer bevorzugten Ausführungsform in ihrem mittleren Teil einen Schlitz (9) quer zur Hauptachse sowie in axialer Richtung eine Bohrung zur Aufnahme der Kapillare (7) auf. Die Ummantelung (8) gestattet ein sicheres Manipulieren des Probenhalters, verhindert ein Knicken der dünnen Metallkapillaren (7) beim Einspannen in die Hochdruckeinfrieranlage und

erlaubt es, die Proben (6) nach Abschluss des Einfrierzyklus problemlos aus der Apparatur zu entfernen.

Während des Hochdruckgefrierens befindet sich im Innern der Metallkapillare (7) eine wasserhaltige, dünne Probe (6), welche nach einer bevorzugten Ausführungsform ihrerseits in eine Kapillare (10) aus einem porösen Polymerwerkstoff, vorzugsweise Zellulose, gefüllt ist. Die Zellulosekapillare (10) wird nach Eintauchen in einen nicht mit Wasser mischbaren Kohlenwasserstoff (4) (z.B. 1-Pentan, 1-Chlorbutan, usw.), der einen niedrigen Gefrierpunkt aufweist ($<-120^{\circ}\text{C}$), in die Metallkapillare eingeführt. Dadurch wird eine dünne Schicht des Kohlenwasserstoffs zwischen der Zellulosekapillare (10) und der Metallkapillare (7) gebildet.

Fig.2A



EP 0 853 238 A1

Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf Probenhalter für wasserhaltige Proben, sowie auf ein Verfahren zu deren Verwendung, vorzugsweise für das Gefrieren unter hohem Druck.

Ein Verfahren des schnellen Gefrierens wasserhaltiger Proben unter hohem Druck ist aus der deutschen Patentschrift DE-PS 1 806 741 bekannt. Der Vorteil des Gefrierens unter hohem Druck gegenüber Normaldruck kann folgendermassen erklärt werden: Appliziert man während des Abkühlens ca. 2000 bar Druck auf die Probe, so reduziert sich die zur Vitrifikation (keine Eiskristallbildung, keine Segregationen) benötigte Abkühlrate um den Faktor hundert, damit ist es möglich maximal 200µm dicke, scheibenförmige Proben zu vitrifizieren. Es ist ebenfalls festzuhalten, dass bei allfälliger Eisbildung unter Druck die Maschengrösse der Segregationsmuster stark reduziert ist, d.h. ca. 200µm dicke wässrige Proben unter 2000 bar gefroren sind ultrastrukturell (Nanometerbereich) optimal erhalten (STUDER D., MICHEL M., WOHLWEND M., HUNZIKER E.B. und BUSCHMANN M.D., Vitrification of articular cartilage by high pressure freezing, J. of Microscopy 179 (1295), 312-332). Bis heute wurde der Vorteil für das Einfrieren unter hohem Druck für verhältnismässig dicke Proben (Probendicke im Bereich um 2 mm) nicht erkannt. Die Reduktion der Maschengrösse der Segregationsmuster bewirkt, dass derartige Proben im Lichtmikroskop optimal erhalten scheinen, da die im µm-Bereich liegenden Segregationen nicht sichtbar sind.

Der in der Patentschrift DE-B 1 806 741 beschriebene Probenhalter eignet sich schlecht für die Weiterverarbeitung der gefrorenen Proben. Es handelt sich dabei um einen röhrenförmigen, einseitig geschlossenen, dünnwandigen Behälter aus z.B. Kupfer, der an seinem oberen Ende trichterförmig erweitert ist. Die Probe im Innern dieses Probenhalters wird durch eine Hydraulik unter Verwendung einer Druckübertragerflüssigkeit, beispielsweise Wasser, unter Druck gesetzt und durch Aufspritzen eines Kühlmittels von aussen abgekühlt. Es ist bei dieser Vorrichtung fast unmöglich, die Proben nach dem Gefrieren weiter zu verarbeiten. Durch das Anbringen einer Sollbruchstelle konnte wenigstens die sogenannte Gefrierätztechnik (freeze etching) angewendet werden. Mit dieser Technik werden dünne Metallabdrücke hergestellt, die untersucht werden können.

Die kommerziell erhältlichen Hochdruckeinfriergeräte nach dem Stand der Technik verfahren folgendermassen: Sie verwenden flüssigen Stickstoff von ca. 150°C sowohl als Druckübertragungs- wie auch als Kühlmittel. Dessen Temperatur beträgt bei Normaldruck -196°C, bei 2000 atm ist er bei dieser Temperatur fest. Die apparativen Nachteile derartiger Anlagen, bei denen flüssiger Stickstoff sowohl als Druckübertragungs- als auch als Kühlmittel eingesetzt wird, bestehen in folgendem: Die Maschinen sind verhältnismässig

gross (ca. 0.8x1.6x1.5m³) und schwer (>600kg). Ihr Einsatz ist mit einem Unfallrisiko für das Bedienungspersonal verbunden: Das Aufspritzen von mehr als 100 ml flüssigem Stickstoff unter 2000 bar erfordert relativ grosse Bohrungen in der Druckkammer, welche dementsprechend sehr massiv konstruiert werden muss. Unfälle sind bekannt; bis heute entstanden keine Personenschäden, der Sachschaden kann jedoch sehr hoch ausfallen (5-20kFr). Die Kosten dieser Apparaturen sind nach wie vor verhältnismässig hoch, da sie in kleinen Stückzahlen aus hochwertigen Werkstoffen gefertigt werden müssen (150-300kFr.).

Die biologischen Proben befinden sich in derartigen Anlagen in zwei dünnwandigen metallischen Halbschalen (sog. aluminium sandwich: 3 mm Aussendurchmesser, innerer Durchmesser 2 mm, mit variabler Hohlraumdicke von 100-600µm), die zwischen zwei Stahllamellen festgedrückt werden. Diese Lamellen sind ihrerseits an einem massiven Stahlkolben (Probenhalter) festgeschraubt. Dieser Probenhalter wird mit der Probe in eine Hochdruckkammer eingeführt und durch einen massiven Querbolzen arretiert. Die Hochdruckkammer wird durch einen dichtenden O-Ring am Probenhalter verschlossen.

Der Einfrierzyklus läuft in diesen Anlagen folgendermassen ab: Um Druckanstieg und Kühlung zu koordinieren, wird die Hochdruckkammer zuerst für ca. 30 ms mit Ethanol gefüllt, um die korrekte Korrelation von Druckanstieg und Kühlung zu ermöglichen. Dann werden durch einen Hochdruckzylinder ca. 100 -160 ml kalter flüssiger Stickstoff in 300-600 ms durch die Druckkammer geleitet. Die Druckkammer weist einen Auspuff auf, dessen Durchmesser wesentlich kleiner als die Zuleitung dimensioniert ist. Der Druck wird durch Stauung an diesem Auspuff aufgebaut. Würde die Druckkammer nicht in der geschilderten Art vorgängig mit Ethanol gefüllt, würde die Probe gefroren, bevor sie unter Druck gesetzt wurde. Ethanol in der Druckkammer ist notwendig für die korrekte Abstimmung von Druckaufbau und Kühlung. Nachteilig wirkt sich dabei aus, dass Ethanol in die Probe diffundieren und darin Artefakte bilden kann. Zudem werden nach dem geschilderten Verfahren Suspensionen oft aus den Metallhalbschalen ausgeblasen.

Reproduzierbare Resultate werden dadurch erreicht, dass die Halbschalen in 1-Hexadecen getaucht mit der biologischen Probe bestückt werden. 1-Hexadecen weist gegenüber wässrigen Lösungen folgende Vorteile auf: Es können ausserhalb der Probe keine Eiskristalle entstehen; die kleine Oberflächenspannung vermeidet Gasblasen zwischen den Halbschalen, welche beim Druckaufbau kollabieren würden. Da 1-Hexadecen mit Wasser nicht mischbar ist, wird die wässrige Probe während der Präparation nicht verändert. Der Gefrierpunkt liegt bei 4°C, erhöht sich jedoch unter Druck (2000 atm.) auf ca. 25°C, wodurch sich eine feste, jedoch nicht rigide "Schale" um die wässrige Probe bildet. Diese "Schale" ist wichtig um während

des Abkühlprozesses unter hohem Druck die Proben nicht zu verlieren, da der Stickstofffluss eine Geschwindigkeit von mehr als 40m/s aufweist (STUDER D., MICHEL M. und MÜLLER M. High pressure freezing comes of age, Scanning Microscopy Supplement 3, Vol. 189, S. 253-269).

Allerdings sind biologische Proben in der Form von Suspensionen mit dieser Technik unter Verwendung von 1-Hexadecen immer noch schwierig zu handhaben. Deshalb wurden für die Aufnahme der biologischen Proben vorzugsweise Zellulosekapillaren von ca. 200 µm innerem Durchmesser und 10 bis 15 µm Wandstärke der porösen Wand eingesetzt, welche in Stücke von ca. 2 mm Länge zugeschnitten, zwischen die metallischen Halbschalen gelegt und leicht eingeklemmt werden. Diese Zellulosekapillaren sind im Probenhalter von 1-Hexadecen umgeben. Die Proben werden, wie bereits dargestellt, in einer Druckkammer nach dem Stand der Technik gefroren und können nach dem Frieren aus den dünnwandigen, metallenen Halbschalen, die als Probenhalter dienen, manuell herausgenommen werden. (H. HOHENBERG, K. MANNWEILER, M. MÜLLER, High-pressure freezing of cell suspensions in cellulose capillary tubes, Journal of Microscopy 175 (1294), 34-43, insbesondere Fig. 1 S. 35).

Der Nachteil derartiger Probenaufnehmer aus metallischen Halbschalen besteht darin, dass die Manipulation der gefrorenen Proben, insbesondere ihr Entfernen aus dem festen 1-Hexadecen, schwierig ist und häufig zur Beschädigung oder zum Verlust von Proben führt. Daneben eignen sie sich aufgrund ihrer Geometrie nicht für die apparativ einfachere und dadurch kostengünstigere Druckübertragung auf die Probe durch einen getrennten Kreislauf für die Druckübertragungsflüssigkeit, wie er beispielsweise in DE-PS 1 806 741 beschrieben ist.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand dementsprechend darin, Probenhalter für die Aufnahme von wasserhaltigen Proben, insbesondere in Kapillaren aus Zellulose oder anderen Werkstoffen, zu konstruieren, welche für eine Verwendung im Rahmen von Hochdruckgefrierapparaturen mit getrennten Kreisläufen von Druckübertragungs- und Kühlmittel geeignet sind und eine leichte und sichere Manipulation der gefrorenen Proben, insbesondere bei deren Entnahme aus dem Probenhalter, gewährleisten. Zu diesem Zweck war es erforderlich, Probenhalter zu konstruieren, welche

- (-) hohe Abkühlgeschwindigkeiten auf die Probe übertragen,
- (-) ein schnelles Einfrieren unter hohem Druck ohne Unfallrisiko für das Bedienungspersonal ermöglichen,
- (-) auf einfache Weise mit den Kapillaren aus Zellulose oder anderen Werkstoffen bestückt werden können,
- (-) ein leichtes und sicheres Manipulieren der

gefrorenen Probe, namentlich beim Entfernen der Kapillaren aus dem Probenhalter ermöglichen.

Die Aufgabe wird durch Probenhalter nach dem Kennzeichen des Patentanspruchs 1 sowie durch ein Verfahren zu deren Verwendung nach dem Kennzeichen des Patentanspruchs 10 gelöst.

Der erfindungsgemäße Probenhalter beseitigt den Nachteil schlecht weiter verarbeitbarer gefrorener Proben. Er ermöglicht es, die gefrorenen Proben auf einfache und sichere Weise allen bekannten Weiterverarbeitungsmethoden (Gefrierätzung, Gefrier-trocknung, Gefriersubstitution, Gefrierschneiden, usw.) zuzuführen.

Der erfindungsgemäße Probenhalter eignet sich für die Anwendung in Apparaturen, welche einen getrennten Kreislauf von Druckübertragungs- und Kühlmittel aufweisen, entsprechend den Apparaturen nach der deutschen Patentschrift DE-PS 1 806 741. Dies ermöglicht eine Verwendung in relativ kleinen und kostengünstigen Apparaturen für das Hochdruckeinfrieren. Dadurch verringert sich das Betriebsrisiko des Hochdruckeinfrierens beträchtlich, da diese kleinen Apparaturen mit einem Volumen des Druckübertragungsmittels von weniger als 1ml auskommen, während die Apparaturen, welche flüssigen Stickstoff sowohl als Druckübertragungs- als auch als Kühlmittel einsetzen, mit den Probenhaltern nach dem Stand der Technik mindestens 100ml Druckübertragungsmittel benötigen. Beim Einsatz der erfindungsgemäßen Probenhalter in den Apparaturen mit getrenntem Kreislauf von Druckübertragungs- und Kühlmittel würde daher bei einem Unfall eine rund hundertmal kleinere Druckmittelmenge als in den Apparaturen mit flüssigem Stickstoff als Druckübertragungs- und Kühlmittel freigesetzt, welche nur sehr geringen Schaden anrichten dürfte.

Mit den erfindungsgemäßen Probenhaltern wird die Voraussetzung geschaffen, das Einfrieren von Proben unter hohem Druck für die Licht- und Elektronenmikroskopie erfolgreich in Medizin und Biologie anzuwenden. Das breite Spektrum von Proben, die mit den erfindungsgemäßen Probenhaltern unter hohem Druck kostengünstig gefroren werden können, dürfte die Anwendungsmöglichkeiten der Hochdruck-Einfrier-Methode in den Naturwissenschaften (Ultrastrukturbeschreibung) noch wesentlich erweitern. Das Hochdruck-Einfrieren von verhältnismässig dicken Proben erscheint besonders vorteilhaft für Anwendungen in der Pathologie, da mit dem für dickere Proben beschriebenen Probenhalter qualitativ gute histologische Schnitte für die Diagnose in kürzester Zeit, etwa während einer laufenden Operation, hergestellt werden können.

Im folgenden werden bevorzugte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Probenhalter sowie deren Verwendung anhand von Zeichnungen beispielhaft dargestellt. Dabei zeigen:

- Fig. 1-A einen Längsschnitt eines Probenhalters, der aus einem massiven, metallischen, gut wärmeleitenden Rohr besteht;
- Fig. 1-B einen vergrösserten Querschnitt eines Probenhalters gemäss B-B in Fig. 1-A;
- Fig. 1-C eine vergrösserte Einzelheit gemäss Ausschnitt C in Fig. 1-A;
- Fig. 2-A einen Längsschnitt eines Probenhalters für zylindrische, dünne Proben mit einem Innendurchmesser im Bereich von 0.3mm;
- Fig. 2-B einen Querschnitt des Probenhalters gemäss B-B in Fig. 2-A;
- Fig. 2-C eine vergrösserte Einzelheit gemäss Ausschnitt C in Fig. 2-A;
- Fig. 3-A einen Längsschnitt eines Probenhalters für zylindrische, dünne Proben mit einem Innendurchmesser im Bereich von 0.3mm;
- Fig. 3-B einen Querschnitt eines Probenhalters gemäss B-B in Fig. 3-A;
- Fig. 3-C eine vergrösserte Einzelheit gemäss Ausschnitt C in Fig. 3-A;
- Fig. 4-A einen schematischen Querschnitt durch eine Kühlkammer einer Hochdruckgefrierapparatur mit einer darin eingesetzten Probenhalterung für zylindrische, dünne Proben;
- Fig. 4-B eine vergrösserte Einzelheit gemäss Ausschnitt B in Fig. 4-A

Der Probenhalter gemäss Fig. 1 weist ein massives, metallisches gut wärmeleitendes Rohr 1 auf (vorzugsweise aus Kupfer, Innendurchmesser vorzugsweise im Millimeterbereich, Wandstärke entsprechend dem Innendurchmesser, Länge je nach Anforderungen im Bereich zwischen ca. 10 bis 20 mm). Dieses Rohr 1 weist an beiden Stirnseiten eine Ausnehmung 2 auf, welche beispielsweise in der Form eines Konus ausgestaltet sein kann und zur Aufnahme der Anschlüsse für das Druckübertragungsmittel dient. In diesem Rohr 1 ist ein sehr dünnwandiges zweites Rohr 3 aus einem relativ gut wärmeleitenden Werkstoff, vorzugsweise einem geeigneten Polymer, eingesetzt, dessen Länge vorzugsweise der Länge des Rohres 1 entspricht, und das mit den zur Weiterverarbeitung von Proben üblichen Werkzeugen geschnitten werden kann. Polymer- und Metallrohr sind durch eine sehr dünne Schicht 4 einer nicht mit Wasser mischbaren Substanz, vorzugsweise eines Kohlenwasserstoffs (z.B. 1-Penten, 1-Chlorbutan, etc.) getrennt, die einen sehr niedrigen Gefrierpunkt ($<120^{\circ}\text{C}$) aufweist. Diese Schicht 4 wird dadurch gebildet, dass eine verhältnismässig „dicke“, wasserhaltige Probe 5 in das „Röhrchen“ 3 eingebracht, dieses anschliessend in die Flüssigkeit, z.B. den Kohlenwasserstoff 4 eingetaucht und in das Rohr 1 eingeschoben wird. Überflüssiger Kohlenwasserstoff tritt an der Gegenseite des Rohres 1 aus und kann dort manuell abgewischt werden. Während des Verfahrens des Hochdruckgefrierens befindet sich die

Probe 5 im Polymerröhrchen 3.

Der Probenhalter gemäss Fig. 2 eignet sich für zylindrische, „dünne“ Proben 6 mit einem Durchmesser vorzugsweise im Bereich von max. 0.3mm. Er weist eine gut wärmeleitende metallische Kapillare 7 auf, die in einer bevorzugten Ausführungsform aus Kupfer besteht, einen bevorzugten Innendurchmesser im Bereich zwischen 0.1 bis 0.5 mm, vorzugsweise von 0.3 mm, sowie eine bevorzugte Wandstärke im Bereich von 0.3 bis 0.5 mm aufweist. Diese Kapillare 7 ist an beiden Stirnseiten mit je einer Ausnehmung, beispielsweise einem Innenkonus 2, zur Aufnahme der Anschlüsse von Leitungen, beispielsweise für ein Druckübertragungsmittel (Hochdruckleitungen) ausgestattet. Die Ummantelung 8 in der Form eines Hohlzylinders umgibt diese Kapillare 7 und stellt einen integralen Bestandteil des Probenhalters dar. Sie ist vorzugsweise aus rostfreiem Stahl hergestellt und weist in ihrem mittleren Teil eine Ausnehmung in der Form eines Schlitzes 9 quer zur Hauptachse sowie in axialer Richtung eine Bohrung mit einem Durchmesser entsprechend dem Aussendurchmesser der Kapillare 7 auf. Die Kapillare 7 wird formschlüssig in diese Ummantelung 8 gepresst. Diese Ummantelung 8 gestattet ein einfaches Manipulieren der Probenhalter, verhindert das Knicken der dünnen Metallkapillaren beim Einspannen in die Hochdruckeinfrieranlage und erlaubt es, die Proben nach Abschluss des Einfrierzyklus problemlos aus der Apparatur zu entfernen, da ein Klemmen durch deformierte Kapillaren sicher verhindert wird.

Während des Hochdruckgefrierens befindet sich eine wasserhaltige, dünne Probe 6, welche ihrerseits in eine Kapillare 10 aus einem porösen Polymerwerkstoff gefüllt ist, im Innern der Metallkapillare 7. Der Polymerwerkstoff soll einerseits porös sein und andererseits mit den zur Weiterverarbeitung von biologischen Proben üblichen Werkzeugen geschnitten werden können. Beispielsweise erfüllen Kapillaren aus poröser Zellulose, wie sie in Blutdialyse-Einheiten verwendet werden, diese beide Kriterien. In einer bevorzugten Ausführungsform weist eine derartige Kapillare 10 einen Innendurchmesser im Bereich von 0.1 bis 0.5 mm sowie eine Wandstärke im Bereich von 0.01 bis 0.1 mm auf. Die Kapillare 10 aus dem porösen Werkstoff wird nach Eintauchen in eine nicht mit Wasser mischbare Flüssigkeit 4, vorzugsweise einem Kohlenwasserstoff bzw. einem halogenierten Kohlenwasserstoff (z.B. 1-Penten, 1-Chlorbutan, usw.), der einen niedrigen Gefrierpunkt aufweist ($<120^{\circ}\text{C}$), in die Metallkapillare 7 eingeführt. Dadurch werden die Kapillare 10 aus dem porösen Werkstoff und die Metallkapillare 7 durch eine dünne Schicht der Substanz 4, vorzugsweise eines Kohlenwasserstoffs voneinander getrennt.

Die vorzugsweise eingesetzten Zellulosekapillaren stammen beispielsweise aus Blutdialyse-Einheiten. Sie sind polyvalent einsetzbar und ermöglichen es, kleine Organismen (z.B. Nematoden), Einzeller, Mikroorganismen, aber auch Gewebe-Mikrobiopsien (Hirn, Leber,

etc.), sowie Gele, Suspensionen usw. unter hohem Druck zu frieren.

Der Probenhalter gemäss Fig. 3 eignet sich ebenfalls für zylindrische, verhältnismässig dünne Proben 6 mit einem Durchmesser im Bereich von max. 0.3mm und besteht aus einer gut wärmeleitenden Metallkapillare 7 (vorzugsweise aus Kupfer), die an ihren Stirnseiten mit je einer Ausnehmung 2, beispielsweise in der Form eines Konus, zur Aufnahme der Anschlüsse für das Druckübertragungsmittel versehen ist.

Im Unterschied zum Probenhalter aus Fig. 2 ist die Kapillare 7 an ihren beiden Stirnseiten mit je einem Hohlzylinder 11, vorzugsweise aus rostfreiem Stahl ummantelt, welche einen Integralen Bestandteil des Probenhalters darstellt und zusammen mit diesem manipuliert werden. Der Unterschied zur Ummantelung 8 aus Fig. 2 besteht darin, dass die Abkühlung der Probe effizienter ist, der Probenhalter jedoch insgesamt weniger stabil ist. Die wasserhaltige Probe 6 im Innern der Metallkapillare 7 ist in eine Kapillare 10 der beschriebenen Art aus einem porösen Polymerwerkstoff gefüllt. Die Metallkapillare und die Kapillare aus dem porösen Werkstoff sind in der gleichen Art wie für die Probenhalter aus Fig. 1 und 2 beschrieben durch eine Schicht einer nicht mit Wasser mischbaren Substanz 4, vorzugsweise eines Kohlenwasserstoffes bzw. halogenierten Kohlenwasserstoffes (z.B. 1-Penten, 1-Chlorbutan, etc.) getrennt, welcher einen sehr niedrigen Gefrierpunkt ($< -120^{\circ}\text{C}$) aufweist und eine optimale Wärmeleitung zwischen Probe 6 und Metallkapillare 7 gewährleistet.

Die Länge der Kapillare 7 kann derart gewählt werden, dass diese entweder innerhalb der Ummantelung 8 bzw. 11 oder bündig mit deren Frontfläche endet (Fig. 2-A und 3-A) oder mit einem oder beiden Enden aus der Ummantelung herausragt. Das Rohr 1 oder die Ummantelung 8 bzw. 11 kann an ihrer Aussenfläche mit einer Ausnehmung in der Form einer Ringnut versehen sein. Diese Ausnehmung dient dazu, das Rohr 1 bzw. die Ummantelung 8 bzw. 11 und damit das Röhrchen 3 bzw. die Kapillare 7 an einer vorbestimmten Stelle in einem Probenhalteraufnehmer 13 einer Untersuchungsanlage, beispielsweise einer Hochdruckgefrieranlage, zu verankern.

Das Verfahren zur Verwendung der erfindungsgemässen Probenhalter zum Zwecke des Hochdruckeinfrierens wasserhaltiger Proben weist die nachfolgenden Verfahrensschritte auf. Für die verhältnismässig „dicken“ Proben der Fig. 1 wird das gleiche Verfahren angewendet; die Manipulationen sind jedoch einfacher auszuführen, da die Dimensionen grösser sind. Die wasserhaltigen Proben 6, vorzugsweise aus biologischem Material, werden folgendermassen in die porösen Kapillaren 10 und die Metallkapillare 7 eingebracht: Die Kapillaren 10, vorzugsweise aus poröser Zellulose, werden in an sich bekannter Weise mit einem geeigneten Klebstoff in Pipettenspitzen aus Kunststoff (Spitzen von sogenannten Eppendorf®-Mikropipetten) geklebt.

Durch Aufsetzen dieser Spitzen auf eine Mikropipette von entsprechender Grösse wird die Probe unter Beobachtung durch eine Stereolupe entweder durch Ausnutzung der Kapillarkräfte oder durch leichtes Ansaugen in die poröse Kapillare 10 eingefüllt. Bei den heute verwendeten Biopsienadeln muss das mikrobiopsierte Gewebe vor dem Aufsaugen der Länge nach mit einer Rasierklinge oder einem anderen geeigneten Instrument geteilt werden.

Unter Beobachtung durch eine Stereolupe werden die Probenhalter in eine mit Flüssigkeit 4, vorzugsweise einem nicht mit Wasser mischbaren Kohlenwasserstoff bzw. halogenierten Kohlenwasserstoff mit tiefem Schmelzpunkt gefüllte Petrischale gelegt, wodurch sich die Metallkapillaren 7 mit der Flüssigkeit auffüllen. Ein auf dem Boden der Petrischale liegendes Filterpapier dient zum Entfernen überschüssiger Probenflüssigkeit an der Oberfläche der mit der Probe 6 gefüllten Kapillare 10 aus porösem Werkstoff. Die derart von überschüssiger Probenflüssigkeit befreite Kapillare 10 wird mit Hilfe zweier Pinzetten oder anderer geeigneter Instrumente manuell in die Metallkapillaren 7 eingeführt. Die Länge der porösen Kapillare 10 sollte dabei der Länge der Metallkapillare 7 entsprechen. Dies ist wichtig, da durch den Einfrierzyklus nur derjenige Bereich der Probe 6 in der porösen Kapillare 10 gut gefroren wird, der sich im Bereich der Metallkapillare 7 befindet, welcher nicht von der Ummantelung 8 bzw. 11 ummantelt ist. Das Bestücken der Probenhalter mit der Probe 6 sollte nur wenige Sekunden dauern, um Fremdeinflüsse auf die Probe 6 so gering wie möglich zu halten. Die bestückten Probenhalter werden unverzüglich eingefroren.

Das Verfahren zum Einfrieren der erfindungsgemässen Probenhalter unter hohem Druck wird in der Fig. 4 an einem Probenhalter 12 gemäss Fig. 3 erläutert, gilt jedoch sinngemäss auch für die Probenhalter, die in Figur 1 und 2 dargestellt sind. In Fig. 4 wird der Probenhalter 12 in einen Probenhalteraufnehmer 13 an sich bekannter Konstruktion eingesetzt und mittels eines O-Ringes 14 festgedrückt. Ist das Rohr 1 oder die Ummantelung 8 bzw. 11 an ihrer Aussenfläche mit einer Ringnut ausgestattet, so wird der Probenhalter 12 mittels einer an sich bekannten Konstruktion durch einen Querbolzen, welcher durch eine Bohrung im Probenhalteraufnehmer 13 eingeführt wird und in die Ringnut passt, an einer vorbestimmten Stelle des Probenhalteraufnehmers 13 befestigt. Anschliessend wird der gefüllte Probenhalteraufnehmer 13 in den dafür vorgesehenen zentrierten Bohrungen 15 einer Hochdruckgefrieranlage eingeführt. Die beiden Ummantelungen 11 des Probenhalters 12 passen dabei in die zentrierten Bohrungen 15. Die zentrale Partie des Probenhalters 12, entsprechend dem nicht ummantelten Teil der Metallkapillare 7, liegt in einem Hohlraum 16, der von einem Schlitz der zylindrischen Führung 17 gebildet wird. Dieser ist notwendig, um möglichst grosse Volumina des Kühlmittels (K) pro Zeiteinheit auf

den Probenhalter 12 auftreffen zu lassen.

Der Probenhalter wird anschliessend an den Kreislauf des Druckübertragungsmittels angeschlossen: Die Metallkapillare 7 des Probenhalters 12 wird an ihrem einen Ende durch einen massiven Konus 18, mit einer bestimmten Kraft (F), welche beispielsweise durch einen Pressluftzylinder 19 erzeugt wird, an die konische Öffnung einer Hochdruckleitung 20 gepresst. Der Konus 18 kann auch durch eine in einem Schraubengewinde des Probenhalteraufnehmers 13 bewegliche Schraube gegen die die Metallkapillare 1 bzw. 7 abschliessende, kegelförmige Ausnehmung 2 bewegt werden und dadurch die Metallkapillare 1 bzw. 7 an einem Ende dicht verschlossen werden. Dies ist zweckmässig, wenn die Länge der Metallkapillare 7 so gewählt wird, dass eines ihrer Enden über die Umman-
 5
 10
 15
 20
 25
 30

telung 8 bzw. 11 in die zentrale Bohrung 15 des Probenhalteraufnehmers 13 hinausragt. Die Probe 6 wird nun dicht mit dem Hochdrucksystem, d.h. der konisch zugespitzten Hochdruckleitung 20 verbunden und in den Bohrungen 15 fixiert. Die mit einem Druckübertragungsmittel, beispielsweise Hydrauliköl 21, gefüllte Hochdruckleitung 20, welche mit einem Druckgenerator 22 verbunden ist, setzt die Probe 6 im gewünschten Zeitpunkt unter den gewählten hohen Druck und diese wird anschliessend eingefroren.

Das Kühlmittel wird durch eine massive, nicht dargestellte Zuführung, die den Hohlraum 16 vollständig umgibt, kurzzeitig auf die Metallkapillare 7 umgelenkt. Durch mechanische Kopplung der Kühlmittelablenkung und der Auslösung der Arretierung des Druckkolbens 23 werden innerhalb eines Zeitraums im Bereich von 0.10 bis 50 msec, vorzugsweise unter 20 msec, beispielsweise um 10 msec, Druckwerte im Bereich zwischen 1000 und 3000 bar, vorzugsweise in einem Bereich zwischen 1600 und 2045 bar in der Probe 6 erreicht. Synchron dazu wird eine Abkühlung im Bereich zwischen 50 (fünfzig) und 10^6 (1 Million) $^{\circ}\text{K}/\text{sec}$, vorzugsweise von einigen 1000 $^{\circ}\text{K}/\text{sec}$, an der Oberfläche der Metallkapillare 7 erzielt. Dadurch ergibt sich in der Probe 6 eine Temperatur im Bereich zwischen - 90 und - 196 $^{\circ}\text{C}$, wodurch diese ein gefroren wird. Die in Fig. 1 dargestellten verhältnismässig „dicken“ Proben können zweckmässigerweise auch mit kleineren Abkühlgeschwindigkeiten (unter 5000 $^{\circ}\text{K}/\text{sec}$) eingefroren werden. Zum Abkühlen wird ein kommerziell erhältliches Kühlmittel, vorzugsweise ein Kohlenwasserstoff mit niedrigem Siedepunkt, beispielsweise Propan, eingesetzt, welches in einem Metalltank gelagert wird, welcher von aussen mit flüssigem Stickstoff auf eine Temperatur von ca. - 180 $^{\circ}\text{C}$ vorgekühlt wird.

Unmittelbar nach dem Einfrieren der Probe 6 wird der Pressluftkolben 24 des Pressluftzylinders 19 zurückgezogen und die Probe 6 im Probenhalter 12 mit Hilfe des Handgriffes 25 am Probenhalteraufnehmer 13 aus der Hochdruckgefrieranlage entnommen und bei Atmosphärendruck unverzüglich in flüssigen Stickstoff getaucht. Unter flüssigem Stickstoff wird der Probenhal-

ter 12 mit Hilfe einer Pinzette manuell aus dem Probenhalteraufnehmer 13 entnommen. Der Probenhalter 12 wird bis zur weiteren Verarbeitung der Probe 6 in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Die nunmehr gefrorene Probe 6 wird folgendermassen aus dem Probenhalter 12 entfernt: Der Probenhalter 12 wird unter flüssigem Stickstoff in einen Kryostaten gebracht. Bei der Temperatur des Kryostaten (im Bereich von - 90 bis -140 $^{\circ}\text{C}$, beispielsweise - 120 $^{\circ}\text{C}$) schmilzt der Kohlenwasserstoff 4 (z.B. 1-Penten mit einem Schmelzpunkt von -165 $^{\circ}\text{C}$), der die Zellulosekapillare 10 umgibt. Dadurch lassen sich mit Hilfe eines gekühlten (im Bereich um -120 $^{\circ}\text{C}$) Zylinders, vorzugsweise eines metallischen Instruments, zum Beispiel eines Bohrers mit entsprechendem Durchmesser, die gefrorenen Kapillaren 10 aus dem porösen Polymerwerkstoff unter Beobachtung durch eine Stereolupe aus dem metallischen Hohlzylinder 7 manuell herauschieben. Die derart entnommene Kapillare 10 mit der Probe 6 kann wiederum in flüssigem Stickstoff gelagert oder weiterverarbeitet werden. Anschliessend wird die Probe 6 in den Kapillaren 10 der weiteren Verarbeitung nach einer der an sich bekannten Methoden zugeführt. Die Kapillare 10 aus dem porösen Polymerwerkstoff, vorzugsweise aus poröser Zellulose, stört dabei nicht, insbesondere bildet sie kein Hindernis für das Schneiden der Probe. Gleiches gilt für die Manipulation der verhältnismässig „dicken“ Proben 5. Das dünnwandige Polymerrohrchen 3 des Probenhalters aus Fig. 1, erlaubt ebenfalls jede Art der Weiterverarbeitung.

Patentansprüche

1. Probenhalter für wasserhaltige Proben, vorzugsweise für das Gefrieren unter hohem Druck, dadurch gekennzeichnet, dass er

- (a) einen Hohlzylinder (1, 7) aus einem gut wärmeleitenden, vorzugsweise einem metallischen Werkstoff aufweist,
- (b) einen zylinderrörmigen Innenraum zur Aufnahme einer Probe (6) aufweist,
- (c) welche sich ihrerseits in einem Hohlzylinder (3, 10) aus einem schnittfähigen Werkstoff befindet,
- (d) wobei der Raum zwischen dem Hohlzylinder (3, 10) und der Innenwand des Hohlzylinders (1, 7) durch eine Schicht (4) ausgefüllt ist, welche bei Raumtemperatur flüssig ist.

2. Probenhalter nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Hohlzylinder (3) ein Röhrchen aus einem polymeren Werkstoff ist.

3. Probenhalter nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Hohlzylinder (10) eine Kapillare aus einem porösen Polymerwerkstoff, vorzugsweise aus poröser Zellulose, ist.

4. Probenhalter nach Patentanspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Hohlzylinder (1, 7) an seinen beiden Stirnseiten je eine Ausnehmung (2) zum Anschliessen von Leitungen, vorzugsweise von Druckübertragungsleitungen, aufweist. 6
5. Probenhalter nach Patentanspruch 1, 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, dass er eine Ummantelung (8) aufweist, welche aus einem metallischen Werkstoff gearbeitet ist, die Form eines Hohlzylinders aufweist, welcher seinerseits mit einer Bohrung in axialer Richtung zur Aufnahme einer Metallkapillare (7) sowie in seinem zentralen Bereich mit einem in radialer Richtung angeordneten Hohlraum (9) in der Form eines Schlitzes ausgestattet ist. 10
6. Probenhalter nach Patentanspruch 1, 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, dass er an beiden Stirnseiten je einen Hohlzylinder (11) aufweist, welche zur Aufnahme der Metallkapillare (7) dienen, diese jedoch nicht auf ihrer gesamten Länge umfassen. 15
7. Probenhalter nach Patentanspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Schicht (4) aus einer wasserunlöslichen Substanz, vorzugsweise einem Kohlenwasserstoff mit niedrigem Gefrierpunkt besteht. 20
8. Probenhalter nach Patentanspruch 1, 3 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Metallkapillare (7) einen Innendurchmesser im Bereich von 0,1 bis 0,5 mm und eine Wandstärke im Bereich von 0,3 bis 0,5 mm aufweist. 25
9. Probenhalter nach Patentanspruch 1, 3 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare (10) aus dem porösen Polymerwerkstoff einen Innendurchmesser im Bereich von 0,1 bis 0,5 mm und eine Wandstärke im Bereich von 0,01 bis 0,1 mm aufweist. 30
10. Verfahren zur Verwendung des Probenhalters nach Anspruch 1 für das Gefrieren wasserhaltiger Proben unter hohem Druck, dadurch gekennzeichnet, dass
 - (a) die wasserhaltige Probe (6) in einen Hohlzylinder (3 bzw. 10) eingefüllt wird,
 - (b) der zylindrische Innenraum eines metallischen Hohlzylinders (1, 7) mit einer bei Raumtemperatur flüssigen Substanz (4) aufgefüllt wird,
 - (c) die mit der Probe (6) gefüllte Kapillare (3, 10) manuell in den Innenraum des Hohlzylinders (1, 7) eingeführt wird,
 - (d) der derart gefüllte Hohlzylinder (1, 7) an die entsprechenden Aufnahmevorrichtungen des Druckübertragungskreislaufs einer an sich bekannten Hochdruckgefrieranlage angeschlossen wird,
 - (e) die Probe (6) kurzzeitig unter hohen Druck gesetzt wird,
 - (f) die Probe (6) im Hohlzylinder (1, 7) kurzzeitig stark abgekühlt und dadurch eingefroren wird,
 - (g) die Probe (6) im Hohlzylinder (1, 7) erneut unter atmosphärischen Druck gesetzt wird,
 - (h) die Probe (6) im Hohlzylinder (1, 7) auf eine Temperatur gebracht wird, bei der die gefrorene Schicht (4) schmilzt,
 - (i) die in der porösen Kapillare (10) bzw. dem Polymerröhrchen (3) befindliche Probe (6) durch Einführen eines entsprechend dimensionierten Instruments an der Stirnseite des Hohlzylinders (1, 7) manuell aus dem Hohlzylinder (1, 7) hinausgestossen und
 - (j) in diesem Zustand der weiteren Verarbeitung zugeführt wird.
11. Verfahren nach Patentanspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Hohlzylinder (10) eine Kapillare aus einem porösen Polymerwerkstoff, vorzugsweise aus poröser Zellulose, ist und die Probe (6) durch Kapillarkräfte in die Kapillare (10) gefüllt wird. 35
12. Verfahren nach Patentanspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Hohlzylinder (10) eine Kapillare aus einem porösen Polymerwerkstoff, vorzugsweise poröser Zellulose ist und die Probe (6) durch Ansaugen in die Kapillare (10) gefüllt wird. 40
13. Verfahren nach Patentanspruch 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Flüssigkeit (4) im Innenraum des Hohlzylinders (1, 7) ein nicht mit Wasser mischbarer Kohlenwasserstoff bzw. halogener Kohlenwasserstoff mit tiefem Schmelzpunkt ist. 45
14. Verfahren nach Patentanspruch 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass der gewählte Druckwert innerhalb von 0,10 bis 50 msec, vorzugsweise weniger als 20 msec, in der Probe (6) aufgebaut wird.
15. Verfahren nach Patentanspruch 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass der Druckwert in der Probe (6) im Bereich zwischen 1000 und 3000 bar, vorzugsweise zwischen 1600 bis 2045 bar, liegt.
16. Verfahren nach Patentanspruch 10 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass an der Oberfläche der Metallkapillare (7) eine Abkühlungsgeschwindigkeit von 5000 bis 10^6 (1 Million) °K/sec und eine Temperatur in der Probe (6) zwischen - 90 und - 196 °C erreicht wird. 55

17. Verfahren nach Patentanspruch 10 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass als Kühlmittel ein Kohlenwasserstoff mit niedrigem Siedepunkt verwendet wird, der mit flüssigem Stickstoff auf eine Temperatur von - 180 °C vorgekühlt wird.

5

18. Verfahren nach Patentanspruch 10 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass der Probenhalter (12) nach dem Gefriervorgang auf eine Temperatur im Bereich von - 90 bis - 140 °C gebracht wird, wodurch die Schicht (4) schmilzt.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Fig.1A

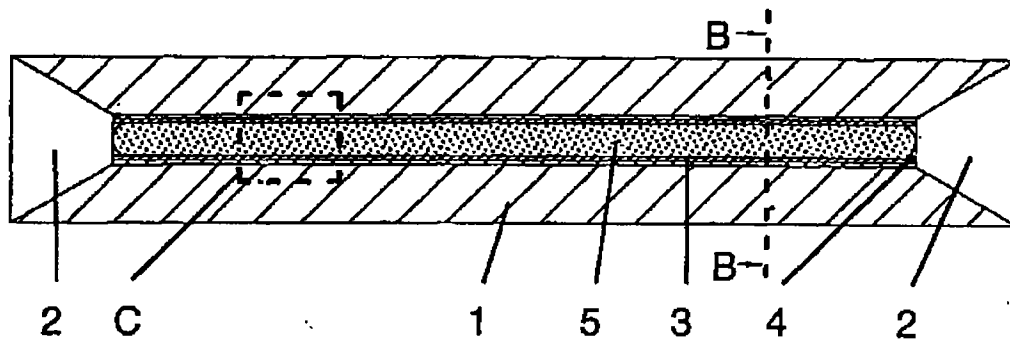


Fig.1B

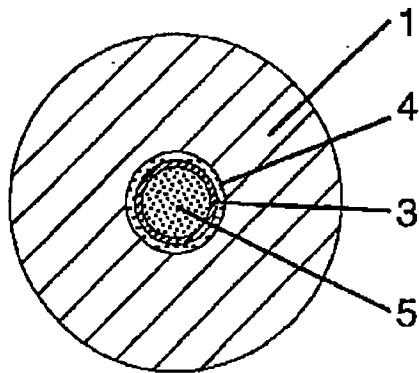


Fig.1C

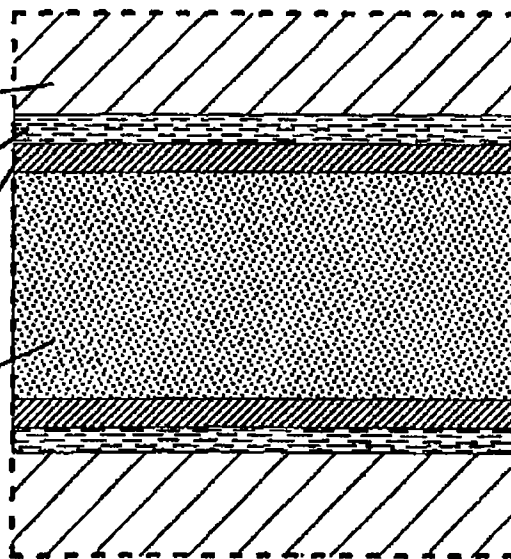


Fig.2A

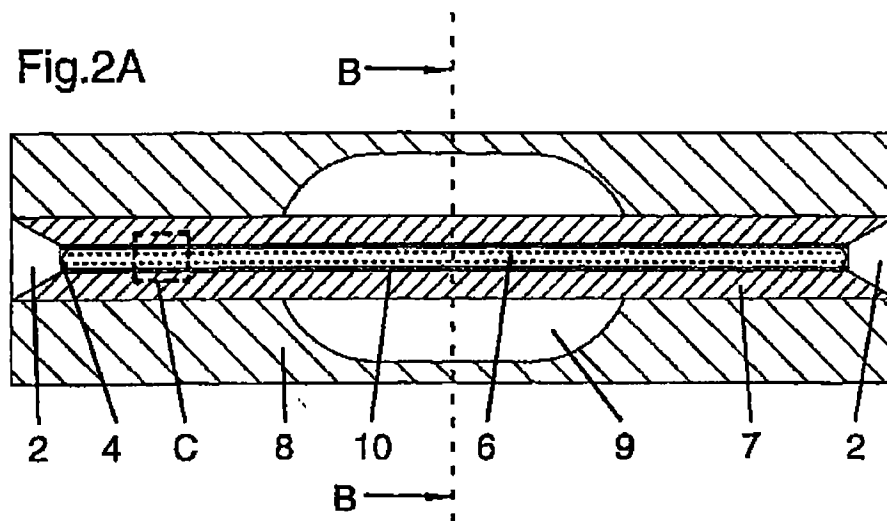


Fig.2B

Fig.2C

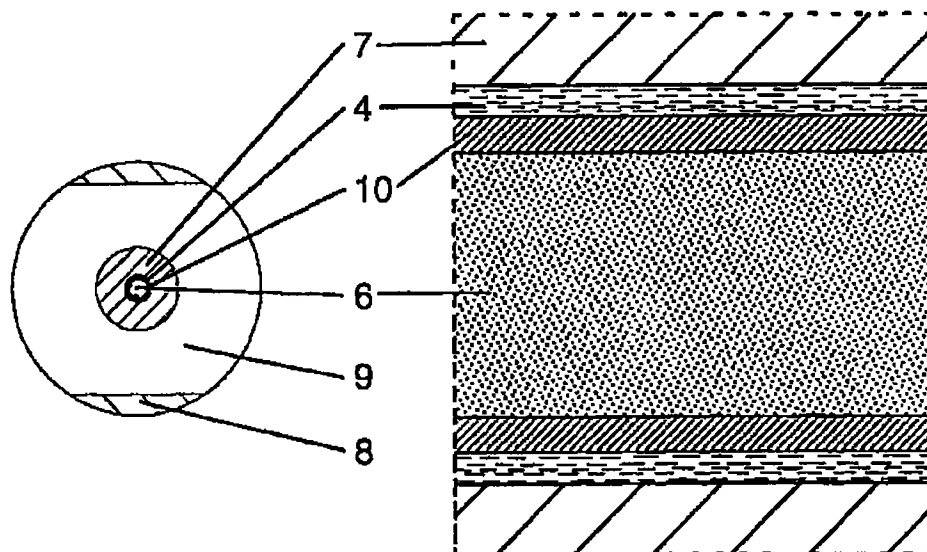


Fig.3A

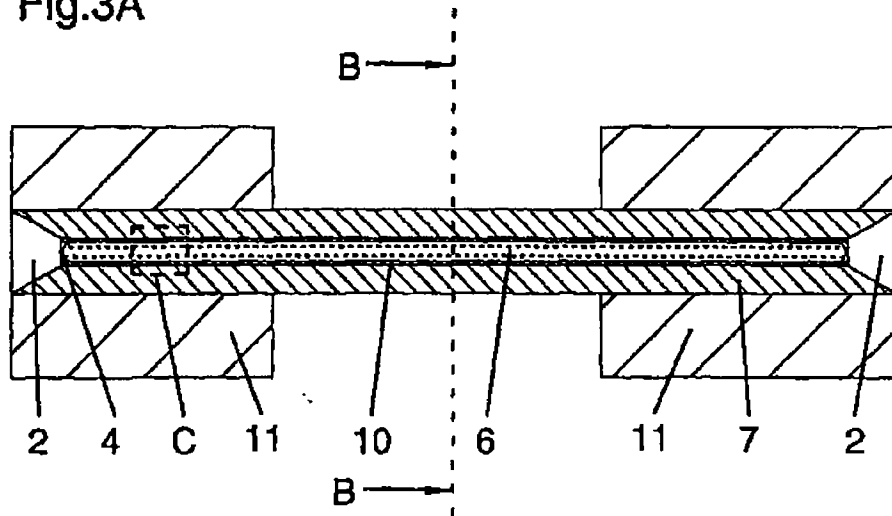
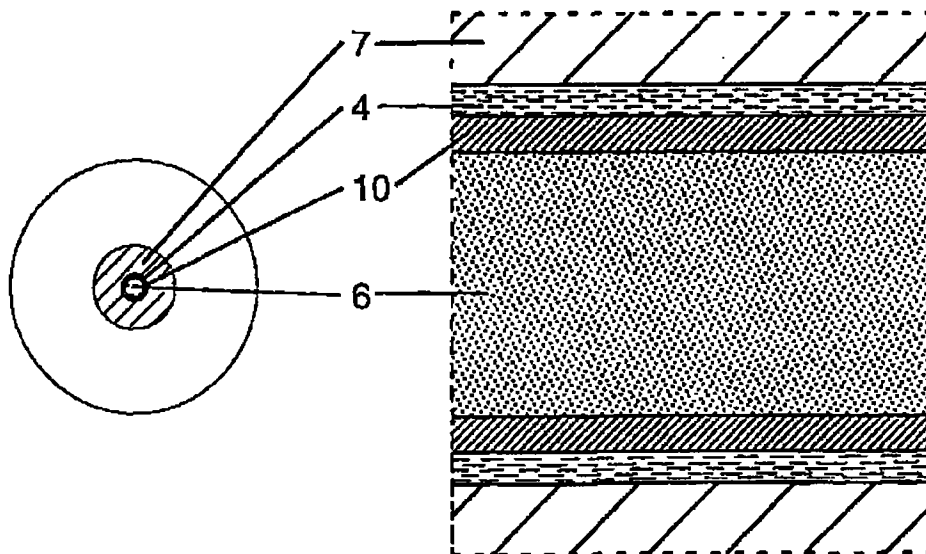
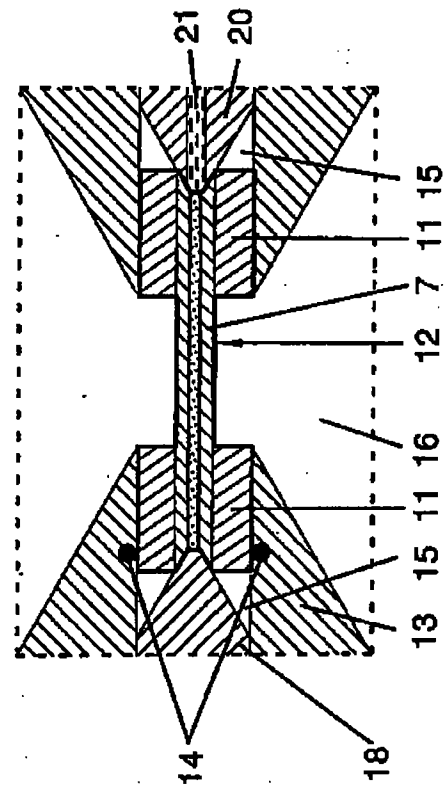
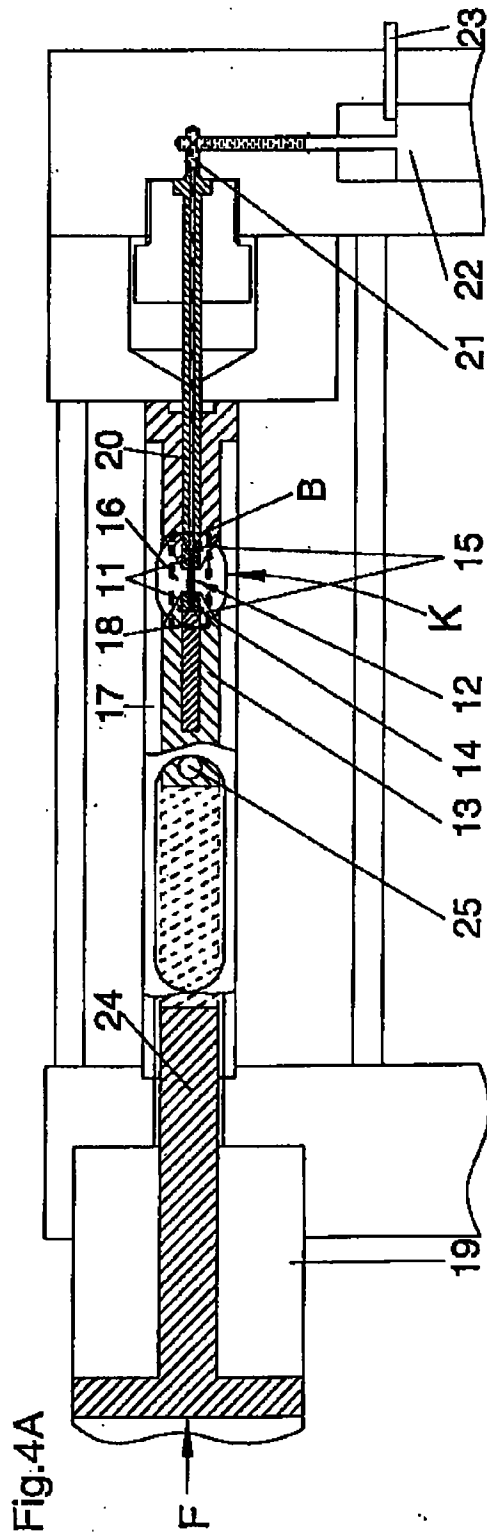


Fig.3B

Fig.3C







Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 98 10 0251

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
D,A	HOHENBERG H ET AL: "HIGH-PRESSURE FREEZING OF CELL SUSPENSIONS IN CELLULOSE CAPILLARY TUBES" JOURNAL OF MICROSCOPY, Bd. 175, Nr. PART 01, Juli 1994, Seiten 34-43, XP000645911 * Seite 35, rechte Spalte - Seite 39, linke Spalte; Abbildung 1 *	1-3, 10-12	G01N1/42
A	US 4 688 387 A (CONAWAY ROBERT M) 25. August 1987 * das ganze Dokument *	1,4	
D,A	DE 18 06 741 A (BALZERS & PFEIFFER HOCHVAKUUM) 19. Juni 1969 * das ganze Dokument *	1	
A	WO 96 02801 A (SEC DEP FOR FOREIGN AND COMMON ; RANA KRISHEN JUGJIVAN (GB)) 1. Februar 1996 * Seite 9 - Seite 11 *	1	
A	EP 0 275 829 A (AGROGEN STIFTUNG ; SEYFFER & CO (CH)) 27. Juli 1988 * Spalte 7, Zeile 49 - Spalte 9, Zeile 54 *	1	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
			B01L G01N
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 16. April 1998	
		Prüfer Bindon, C	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1503 03/82 (P04C03)